

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

14.07.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

2000年 5月 2日

出願番号
Application Number:

特願2000-133519

出願人
Applicant(s):

科学技術振興事業団

REC'D	04 SEP 2000
WIPO	PCT

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月18日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

出証番号 出証特2000-3064571

【書類名】 特許願

【整理番号】 PA903489

【提出日】 平成12年5月2日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県朝霞市北原2-7-9-403

【氏名】 平尾 一郎

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市本町25-17 モトハシフラワー2F

【氏名】 藤原 健志

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区向丘1-20-6-607

【氏名】 横山 茂之

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 川崎 雅弘

【代理人】

【識別番号】 100102668

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

【電話番号】 03-5205-2521

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 039251

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

特2000-133519

【プルーフの要否】 要



【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規な核酸塩基対

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸の塩基部分に、塩基相互間の立体障害及び静電的な反発、並びにスタッキング作用を有する基を導入することにより選択的な塩基対を形成させる方法。

【請求項2】 立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基が、天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害するためのものである請求項1に記載の方法。

【請求項3】 立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基が、芳香複素環式基である請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 芳香複素環式基が、異種原子として1又は2個の硫黄原子、酸素原子又は窒素原子を有する5又は6員環の芳香複素環式基である請求項3に記載の方法。

【請求項5】 芳香複素環式基が、チオフェンである請求項4に記載の方法

【請求項6】 さらに、新たな水素結合を形成し得る基を導入する請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対である請求項1～6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼ又はRNAポリメラーゼである請求項7に記載の方法。

【請求項9】 核酸の塩基部分における立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を利用して、選択的な塩基対を形成させるように核酸をデザインする方法。

【請求項10】 立体障害及び静電的な反発の利用により天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、さらにスタッキング作用を有することにより安定化させることにより選択的な塩基対を形成させるように核酸をデザインする方法。

【請求項11】 核酸の塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対である請求項9又は10に記載の核酸をデザインする方法。

【請求項12】 請求項9～11のいずれかに記載の方法でデザインされた核酸。

【請求項13】 核酸が、6位に立体障害を起こさせ得る基を有するプリン誘導体からなる塩基を含有するものである請求項12に記載の核酸。

【請求項14】 核酸の塩基が、2-アミノ-6-チエニループリン又はその誘導体である請求項13に記載の核酸。

【請求項15】 核酸が、2位にヒドロキシ基又はケト基を有するピリジンからなる塩基を含有するものである請求項12に記載の核酸。

【請求項16】 核酸の塩基が、ピリジン-2-オン又はその互変異性体である請求項15に記載の核酸。

【請求項17】 核酸が、その相補的な核酸と塩基対を形成している核酸である請求項12～16のいずれかに記載の核酸。

【請求項18】 請求項12～17のいずれかに記載の核酸を製造する方法。

【請求項19】 核酸が、塩基対を形成し得る他方の核酸である請求項18に記載の製造方法。

【請求項20】 請求項12～17のいずれかに記載の核酸を1個以上含有してなるコドン。

【請求項21】 コドンがアミノ酸をコードするものである請求項20に記載のコドン。

【請求項22】 アミノ酸が非天然型のアミノ酸である請求項21に記載のコドン。

【請求項23】 請求項12～17のいずれかに記載の核酸、及び天然に存在する核酸を含有してなる核酸分子。

【請求項24】 核酸分子が蛋白質をコードしてなる請求項23に記載の核酸分子。

【請求項25】 核酸分子が、天然の遺伝子の遺伝情報の全部又は一部を保

持している請求項23又は24に記載の核酸分子。

【請求項26】 請求項23～25のいずれかに記載の核酸分子にポリメラーゼを作用させて、その相補鎖を有する核酸分子を製造する方法。

【請求項27】 ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼ又はRNAポリメラーゼである請求項26に記載の方法。

【請求項28】 天然の遺伝子に、請求項12～17のいずれかに記載の核酸を1個又は2個以上導入又は置換させて非天然型の遺伝子を製造する方法。

【請求項29】 請求項12～17のいずれかに記載の核酸を導入又は置換された位置が、コドン単位となっており、他の部分のアミノ酸配列が天然のものと変更されていない塩基配列となる請求項28に記載の非天然型の遺伝子を製造する方法。

【請求項30】 請求項23～25のいずれかに記載の核酸分子、又は請求項28又は29の方法で得ることができる非天然型の遺伝子に基づいて、それが含有しているコドンに基づいたアミノ酸の配列を有する蛋白質を製造する方法。

【請求項31】 天然の蛋白質のアミノ酸の一部又は全部に非天然型のアミノ酸が導入又は置換された蛋白質である請求項30に記載の蛋白質を製造する方法。

【請求項32】 請求項28又は29に記載の方法により製造され得る非天然型の遺伝子で形質転換された微生物。

【請求項33】 請求項28又は29に記載の方法により製造され得る非天然型の遺伝子を用いて、天然の遺伝子がコードしている蛋白質の各アミノ酸の機能をスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、立体障害を利用した選択的な新規人工核酸塩基対の形成に関する。

また、本発明は、本発明の新規人工核酸塩基対を使用した核酸の複製、転写、および、これを用いたタンパク質合成システムあるいは機能性核酸に関する。より詳細には、本発明は、立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を利用し

た選択的な塩基対を形成させることができる新規な人工核酸、その製造方法、それを含有してなるコドン、それを含有してなる核酸分子、それを用いた非天然型の遺伝子の製造方法、前記核酸分子又は非天然型の遺伝子を用いた新規な蛋白質の製造方法などに関する。

【0002】

【従来の技術】

地球上の生物は、すべて遺伝子としてアデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）の4種類の塩基からなる核酸を用い、AとT、GとCの特異的な塩基対形成によってその遺伝情報を伝えている。また、遺伝子DNAから転写されたmRNA中の遺伝情報に従ってタンパク質が合成される。その際、3塩基からなる64種類（ $4^3 = 64$ ）のコドンがそれぞれ20種類のアミノ酸に対応している。

もし、4種類（A, G, C, T）の既存の塩基に加えて新規な核酸塩基（X, Y）（ここでは、XとYが特異的に塩基対を形成する）を創製することができればコドンの種類が飛躍的に増大し（ $6^3 = 216$ ）、新たにできたコドンを非天然型アミノ酸に対応させることにより、非天然型アミノ酸を含むタンパク質の合成が可能となる（J. D. Bain, et al., Nature, 356, 537-539 (1992)）。

【0003】

これまで、A-T及びG-C以外の人工塩基対として、イソシトシンとイソグアニンが報告されているが、イソグアニンの互変異性のためにイソシトシンよりもチミンと塩基対を形成し易い事が問題となっている（C. Switzer, et al., J. Am. Chem. Soc., 111, 8322-8323 (1989); C. Y. Switzer, et al., Biochemistry, 32, 10489-10496 (1993).）。また、その他にもいくつかの新規塩基対の報告があるが、いずれもまだ、ポリメラーゼによる認識に問題があり実用化されていない（J. A. Piccirilli, et al., Nature, 343, 33-37 (1990); J. Horlacher, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6329-6333 (1995); J. C. Morales, et al., Nature struct. biol., 5, 954-959 (1998)）。

【0004】

ところで、様々な機能をもつ核酸分子がインビトロセレクション法によって見

いだされているが (A. D. Ellington, et al., *Nature*, 346, 818-822 (1990); C. Tuerk, et al., *Science*, 249, 505-510 (1990))、前記したX-Yのような新規な塩基対がDNAポリメラーゼ (DNA polymerase)、RNAポリメラーゼ (RNA polymerase) 及び逆転写酵素 (reverse transcriptase) の各種ポリメラーゼ (polymerases) に認識されれば、現在、4種類の塩基で行われているインビトロセレクション法を6種類の塩基で行うことができ、4種類の塩基では実現できない新しい機能をもつ核酸分子の創製の可能性が期待できる。

また、遺伝子の1個又は2個以上の塩基が他の塩基になっているために発現する遺伝病の治療に、新しい塩基対の創製が期待されている。

【0005】

本発明者らは、非天然型塩基同士で選択的な塩基対を形成させるために、非天然型塩基と天然型塩基の塩基対の形成を立体障害により排除する方法をこれまでに開発してきた。そして既に非天然型塩基をもつ2-アミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(2-デオキシ- β -D-リボフラノシリル)プリン ($d \times 1$) を含む錆型DNAを用いて、対応する非天然型塩基ピリジン-2-オンのヌクレオチドの基質 (d_yT_P ならびに r_yT_P) がDNAポリメラーゼやRNAポリメラーゼによりDNAやRNA中に選択的に導入されることを示し特許出願した (特願平11-201450号)。このものは、図1のa及びbに示されるものである。

【0006】

しかし、この塩基 (図1aの $d \times 1$) 中の6-ジメチルアミノ基はその立体的なかさ高さによって、天然型塩基のチミン (あるいはウリジン) (図1b参照) やシトシンとの塩基対をある程度排除することが出来たが、この立体障害が前後に存在する塩基にも影響を与えることから、同時に塩基間のスタッキング等にも不利な影響を及ぼし、Klenowフラグメントによる d_yT_P の取り込み効率は低く、 $d \times 1$ に対するチミジン三リン酸 (d_TTP) の取り込みを抑えることが出来なかった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、DNAポリメラーゼなどのポリメラーゼによって塩基対が認識される際に、塩基対間の立体障害を利用して、選択的な新規な人工核酸塩基対を形成させる際に、さらに塩基間のスタッキングには悪影響を及ぼさず、塩基対平面にのみその立体障害を引き起こさせ、さらに好ましくは天然型の塩基との静電的な反発が利用でき得る塩基を選択するという概念を提供するものである。

即ち、本発明は天然の核酸とは塩基対を形成せず、それら自体で選択的に塩基対を形成し、かつ各種のポリメラーゼに認識され得る新規な人工の核酸塩基対を提供するものである。さらに、本発明は、これらの人工の核酸、それを含むコドン、核酸分子、非天然型の遺伝子、及びそれらの応用方法を提供するものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、本発明は天然の核酸とは塩基対を形成せず、それら自体で選択的に塩基対を形成し、かつ各種のポリメラーゼに認識され得る新規な人工の核酸塩基対を創製すべく鋭意研究してきたところ、立体障害を利用することにより天然の核酸との塩基対の形成を阻害することができ、新たにデザインされた核酸同士で選択的に塩基対を形成させ得ることを見出し、このようにデザインされた核酸が天然の各種ポリメラーゼに十分認識されることも見出した。

例えば、チミン(thymine)と塩基対を形成しないようにチミンの6位のケト基と立体障害によってぶつかりあうように、2, 6-ジアミノプリン(2,6-diaminopurine)の6位のアミノ基に嵩高いメチル基を2つ導入した2-アミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)プリン(2-amino-6-(N,N-dimethylamino)purine)（この塩基をX1という。）をデザインする。こうしてこのX1は、チミンとは塩基対を形成しなくなるが、チミンの6位のケト基を水素に変えた同族体ピリジン-2-オン(pyridin-2-one)（この塩基をYという。）などの塩基は、このX1と塩基対を形成することができることを見出し（図1a及びb参照）、先に特許出願してきた（特願平11-201450号）。

しかし、単に立体障害のみによっては、天然型塩基のチミン（あるいはウリジン）（図1b参照）やシトシンとの塩基対をある程度排除することが出来たが、

充分な選択性を得ることはできなかった。

【0009】

そこで、本発明者らは、立体障害だけでなく、塩基相互間の静電的な反発や、前後の塩基とのスタッキング作用を考慮した新たな人工の塩基対を検討しこそ、選択性の優れた人工の塩基対を得ることができることを見出した。

【0010】

本発明は、DNAポリメラーゼなどのポリメラーゼによって認識され得る、立体障害を利用した選択性的な塩基対を形成し得る新規な人工の核酸塩基対、及び新規な人工の遺伝子を提供するものである。

【0011】

本発明は、核酸の塩基部分に立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基を導入することにより選択性的な塩基対を形成させる方法に関し、より詳細には、当該立体障害及び静電的な反発により、天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、スタッキング作用により前後の塩基と安定に存在し、かつこのような塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対であることを特徴とする選択性的な塩基対を形成させる方法に関する。

また、本発明は、核酸の塩基部分における立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を利用して選択性的な塩基対を形成させるように核酸をデザインする方法に関し、より詳細には、当該立体障害及び静電的な反発の利用により天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、さらに好ましくはスタッキング作用により前後の塩基と安定に存在し、かつこのような塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対であることを特徴とする選択性的な塩基対を形成させ得る核酸をデザインする方法に関する。

さらに、本発明は、核酸の塩基部分に立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基を導入することにより選択性的な塩基対を形成させ得る核酸に関し、より詳細には、当該立体障害及び静電的な反発を起こさせ得る基が、天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、さらに好ましくはスタッキング作用を有する基により前後の塩基と安定に存在するためのものであり、かつこのような塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対であることを特徴と

する選択的な塩基対を形成させ得る核酸、及びその製造方法に関する。

【0012】

即ち、本発明は、天然の塩基を含有する核酸類と同様な挙動をすることができる新規な人工の核酸、及びこのような核酸をデザインする方法を開示するものであり、本発明の核酸は天然の核酸と同様な応用をすることができる。

したがって、本発明は、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を用いた各種の応用に関する。

より詳細には、本発明は、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を1個以上含有してなるコドンに関し、当該コドンは天然の核酸と同様にアミノ酸をコードすることができ、当該アミノ酸としては非天然型のアミノ酸であることもできる。また、本発明は、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸、及び天然に存在する核酸を含有してなる核酸分子に関し、当該核酸分子は天然の核酸と同様に蛋白質をコードすることができ、また、当該核酸分子は天然の遺伝子の遺伝情報の全部又は一部を保持することもできる。このような核酸分子に各種のポリメラーゼ作用させて、その相補鎖を有する核酸分子を製造することもでき、本発明はこのような相補鎖の製造方法にも関する。

【0013】

また、天然の遺伝子の一部に、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を導入又は置換することができ、したがって、本発明は、天然の遺伝子に、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を1個又は2個以上導入又は置換させて非天然型の遺伝子を製造する方法に関し、これらの導入又は置換を前記した本発明のコドン単位にて行うこともできる。

さらに、本発明は、前記した方法により得ることができる非天然型の遺伝子又は前記した本発明の核酸分子に基づいて、それが含有しているコドンに基づいたアミノ酸の配列を有する蛋白質を製造する方法に関し、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を含有するコドンが非天然型のアミノ酸をコードするようにした場合には、天然の蛋白質の一部に非天然型のアミノ酸が導入又は置換された蛋白質を製造することができる。

【0014】



したがって、本発明の方法により天然の蛋白質の一部が、他の天然型又は非天然型のアミノ酸、好ましくは非天然型のアミノ酸に置換又はそれらが導入された新たな蛋白質を製造する方法を提供するものであり、それにより天然の遺伝子がコードしている蛋白質の各アミノ酸の機能をスクリーニングすることができ、本発明は天然の遺伝子がコードしている蛋白質の各アミノ酸の機能をスクリーニングする方法にも関する。

また、本発明は、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸（以下、単に本発明の核酸という。）を含有する非天然型の遺伝子で形質転換された微生物にも関する。

さらに、本発明の新規な塩基対は、天然の塩基と対を形成しないので、遺伝子の1個又は2個以上の塩基が他の塩基になっているために発現する遺伝病等の治療に有用であり、本発明は新規な塩基対又はその一方の塩基からなる医薬組成物を提供するものである。

【0015】

本発明は、天然の核酸の塩基とは塩基対を形成せず、かつポリメラーゼに認識され得る人工の核酸を提供することであるが、従来の人工の核酸は水素結合の位置のみを変更しようとしたために天然の核酸の塩基との塩基対の形成を実質的に阻害することはできず、塩基対の選択性が十分ではなかった。本発明は、係る選択性を立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基を導入するという手法で解決したものであり、人工の核酸同士が選択的に塩基対を形成することができる新規な人工核酸を提供するものである。

したがって、以下で本発明を具体例に基づいてより具体的に説明してゆくが、これらの具体例は本発明をよりよく理解させるためのものであり、本発明がこれらの具体例に限定されるものでないことは前述した本発明の技術的思想から明らかである。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明の核酸の塩基部分に立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基としては、塩基相互間の好ましくない水素結合を阻害することができ

る程度の立体障害を有する基で、静電的な反発を有する基で、かつスタッキング作用を有するための環状の π 電子系を有する基であって、核酸の塩基としての性質に悪影響を及ぼさないものであれば、特に制限はない。さらに好ましくは、核酸の配列における、他の核酸の塩基対の形成を阻害しない程度の大きさのものがよい。また、水素結合が可能となる極性部分や活性水素原子を有していない基が好ましいが、これらの極性部分や活性水素が距離的に水素結合が可能でない箇所に位置する場合には特に留意する必要はない。

本発明の核酸の塩基部分に立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基としては、平面構造を有する芳香複素環式基が好ましい。このような芳香複素環式基は、分子の平面方向において充分な立体障害を起こさせるだけの大きさを有し、異種原子による静電的な反発を起こさせることができ、そして芳香複素環式基の π 電子系によるスタッキング作用も期待することができる。

【0017】

このような芳香複素環式基としては、より具体的には、異種原子として1又は2個の硫黄原子、酸素原子又は窒素原子を有する5又は6員環の芳香複素環式基が挙げられる。これらの芳香複素環式基は、縮合環式、多環式、又は単環式のいずれのものであってもよいが、立体的な大きさからは単環式のものが好ましい。また、これらの芳香複素環式基は必要により各種の置換基を有するものであってもよいが、立体的な制限や好ましくない水素結合が生起することから通常は大きな置換基を持たないものが好ましい。このような置換基としては、水酸基、アミノ基、カルボニル基、炭素数1~5程度の低級アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキルアミノ基、ニトロ基などが挙げられる。

【0018】

このような立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基を塩基中に導入する方法としては、通常の化学合成法を利用することができる。

【0019】

また、本発明の核酸はポリメラーゼに認識され得る人工の核酸であり、ポリメラーゼとしては、いずれのポリメラーゼであってもよいが、好ましくはDNAポリメラーゼやRNAポリメラーゼが挙げられる。また、最近のポリメラーゼの構

造解析の結果は、全てのポリメラーゼと核酸の相互作用が本質的に同じであることを示しており、本発明の塩基対の形成はポリメラーゼ反応の本質に関わるものであり、以下で具体的な説明で用いたDNAポリメラーゼやRNAポリメラーゼに限定されるものではなく、逆転写酵素などを含め全てのポリメラーゼにおいても利用することができる。

【0020】

さらに、最近の分子の立体配置の解析方法や原子間距離の精密な測定方法などにより、核酸の立体配置が計算されるので、これらの結果に基づいて立体障害を起こし、かつ他の位置で相互の核酸の塩基が1個又は2個以上、好ましくは2個の水素結合をし得る塩基の化学構造をデザインすることができる。したがって、本発明は核酸の立体障害、好ましくは核酸の塩基部分における立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用に基づいて人工の核酸をデザインする方法を包含するものである。本発明の塩基対のデザインに当たっては、ワトソン・クリック型塩基対によるデザインが通常であるが、フーグスティーン型塩基対によりデザインしてもよい。

【0021】

本発明の核酸は、核酸の立体障害、好ましくは核酸の塩基部分における立体障害に基づいてその化学構造がデザインされた人工の核酸であればよく、人工の核酸同士が選択的に塩基対を形成するものであればよい。好ましくは、これらの人工の核酸の塩基対がポリメラーゼに認識され得るものであり、ポリメラーゼの作用により天然の核酸と同様にその相補鎖が合成されるものが好ましい。

本発明の核酸は、通常の化学合成法によっても合成することができるが、この方法に限定されるものではない。化学的な合成法の例を図2に例示する。

【0022】

本発明の核酸を、核酸の配列の中に組み込む方法としては、天然の核酸を組み込む通常の方法を又はこれに準じた方法により行うことができる。例えば、DNA合成装置による方法や、ポリメラーゼによる方法や、ポイントミューターション技術などに準じて行うことができる。また、従来の天然の核酸と同様な標識化を行うこともできる。

したがって、本発明は遺伝子断片やプローブなどとして使用される核酸分子であって、前記した本発明の核酸を含有する核酸分子を包含する。本発明の核酸分子は1個又は2個以上の本発明の核酸を含有するものであり、1本鎖のものであっても2本鎖のものであってもよい。また、本発明の非天然型の遺伝子は、天然の遺伝子の一部又は全部を本発明の核酸で置換したもの、天然の遺伝子に本発明の核酸を1個又は2個以上を付加したもの、又はこれらを組み合わせたものが包含される。このような本発明の非天然型の遺伝子は、従来の天然型の遺伝子の改変と同様な方法又は従来の方法に準じた方法により行うことができる。

【0023】

したがって、本発明の核酸分子や非天然型の遺伝子は、従来の天然型のものと同様にこれを適当なベクターに挿入して又はファージなどを用いて、適当な微生物を本発明の核酸を含有する遺伝子により形質転換することができる。

【0024】

また、本発明の核酸を含む新たなコドンを設計することができる。例えば、本発明の新規な人工の核酸の塩基をX及びYとすると、XXY、XYX、YXXなどのこれらの塩基の組み合わせや、AXA、TYT、CGX、ATX、などの天然の核酸の塩基との組み合わせによるコドンを設計することができる。新たなコドンは、天然型のアミノ酸をコードさせることもできるし、また、非天然型のアミノ酸をコードさせることもできる。さらに、転写や輸送などの機能をコードさせることもできる。このように本発明は新規な人工の核酸を提供するのみならず、本発明の核酸を含む新たなコドンの設計による、全く新しい遺伝暗号の設計を可能とするものであり、新たな遺伝暗号の世界を提供するものである。

【0025】

本発明の新たなコドンに応じたtRNA系を設計することにより、非常に多くのアミノ酸を利用可能とする新たな蛋白質合成システムを設計することができる。利用可能なアミノ酸はリボソームにおける蛋白質合成酵素系で利用できるものであればよい。したがって、本発明は前記した本発明のコドンをもちいた新たな蛋白質合成システムを提供するものもある。

従来、天然の蛋白質中の一部のアミノ酸を非天然型のアミノ酸に置換したり、

非天然型のアミノ酸を挿入することは極めて困難であったが、本発明の蛋白質合成システムによれば希望する位置のコドンの核酸を本発明の核酸に置換又は導入することにより、所望の非天然型のアミノ酸を含有する蛋白質を製造することが可能となる。そして、このようなアミノ酸の変更を行うことにより、蛋白質中の各アミノ酸の機能をスクリーニングすることが可能となる。

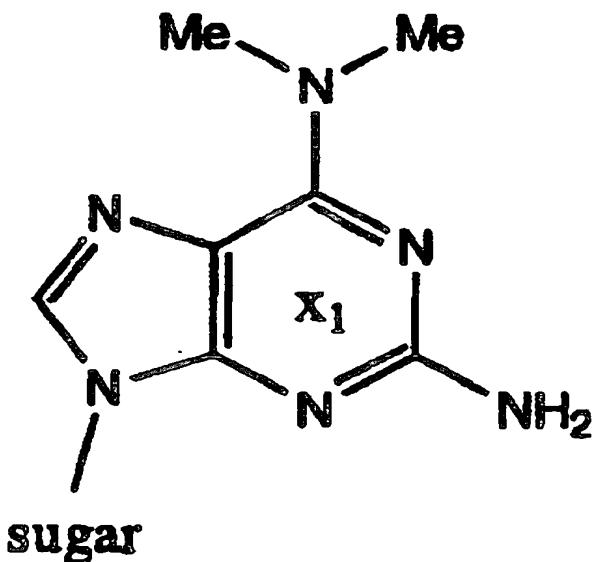
【0026】

次の本発明を具体例により詳細に説明する。

本発明者らは、チミンと塩基対を形成しないようにチミンの6位のケト基と立体障害によってぶつかりあうように、2, 6-ジアミノプリンの6位のアミノ基に嵩高いメチル基を2つ導入した次式で示される、

【0027】

【化1】



【0028】

2-アミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)プリン（以下、この塩基をX1と

いう。) をデザインした。このようにデザインされたX1は、チミンとは塩基対を形成しなくなるが、チミンの6位のケト基を水素に変えた同族体ピリジン-2-オン(以下、この塩基をYという。)などの塩基は、このX1と塩基対を形成することができ(図1a及びb参照)、塩基対X1-Yの選択的な核酸塩基対の形成を検証してきた(特願平11-201450号)。

しかし、このd_x1中の6-ジメチルアミノ基はその立体的なかさ高さによって、天然型塩基のチミン(あるいはウリジン)(図1b参照)やシトシンとの塩基対をある程度排除することが出来たが、同時に塩基間のスタッキング等にも不利な影響を及ぼし、Klenowフラグメントによるd_yTPの取り込み効率は低く、d_x1に対するチミジン三リン酸(dTTP)の取り込みを抑えることが出来なかった。

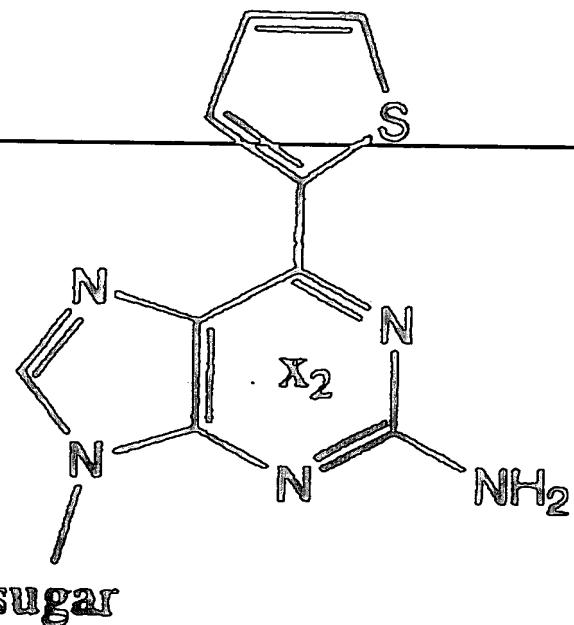
【0029】

そこでこのジメチルアミノ基の代わりに塩基間のスタッキングには悪影響を及ぼさず、塩基対平面にのみその立体障害を引き起こさせるために平面構造を有する芳香族系の置換基をd_xの6位に導入することを行った。

この実験に当たって、その一例として6位にチオフェンを導入した次式で示される。

【0030】

【化2】



【0031】

2-アミノ-6-(2-チエニル)-9-(2-デオキシ- β -D-リボフラノシル)プリン ($d \times 2$: ここでは、この新しい塩基をX2とし、従来の2-アミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(2-デオキシ- β -D-リボフラノシル)プリンを $d \times 1$ とする) の合成を行い、この塩基を含む錆型に対するd γ T Pやr γ T Pの取り込みを調べた。

【0032】

錆型DNA合成用の $d \times 2$ のアミダイト試薬の調製法の概要を図2に示した。詳細は実施例1を参照されたい。このアミダイト試薬は、DNA合成において通常の市販のアミダイト試薬と同様のカップリング収率を示した。

【0033】

まず、Klenowフラグメント ($e \times o^+$) を用いて、錆型中の $d \times 2$ に対する d

y T P の取り込みを調べた（実施例2参照）。

テンプレート及びプライマーとして次の塩基配列のものを使用した。

プライマー 5'-^{3' 2'}PACTCACTATAGGGAGGAAGA-

テンプレート 3'-TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCT-N-TCTCGT

テンプレートのNの箇所に従来の塩基X 1、本発明の塩基X 2及び対照としてAの塩基を結合させて各種の塩基の取り込み実験を行った。結果を図3に示す。

図3にレーン1及び2は対照として使用したアデニン(A)におけるシトシン(C)とチミン(T)の取り込みを示している。

この結果、従来のd x 1に対するd y T Pの取り込み効率は21%（レーン3）であったが、d x 2を用いることにより40%（レーン8）まで取り込み効率が上昇した。同条件での天然型のd Aに対するd T T Pの取り込み効率が57%（レーン2）であることと比較すると、d x 2によりかなりの改善が見られたことになる。d x 1に比べてd x 2は、d C T Pの取り込みが大きくなっている（22%）（レーン11）が、それでもd y T Pの取り込み（40%）に比べるとそれほど大きな値であるということはできない。

【0034】

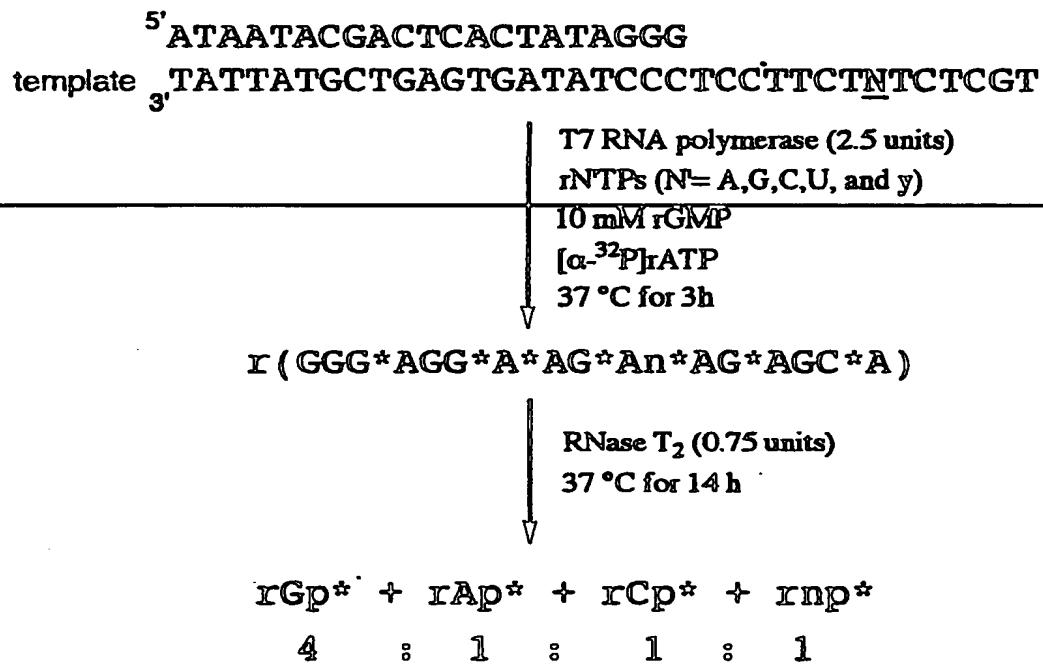
このKlenowフラグメント(e x o⁺)による実験の結果から、従来のd x 1からd x 2を用いることにより、d x 2に対するd C T Pの取り込み効率が上昇したが、これは、シトシンの4-アミノ基とd x 2中のチオフェンの硫黄原子との相互作用によるものと思われる（図1 f 参照）。また、このようにd x 2中のチオフェンの硫黄原子が塩基対面に向いたときは、チミン(T)の4-ケト基と静電的な反発が予想され、これは、塩基対の形成を阻害する要因として、立体的な障害に加えて、静電的な反発（図1 e 参照）を用いることができることを示している。これらのことから、d x 2中のチオフェンは、硫黄原子の側が塩基対面に向いていると考えられる。

【0035】

次に、T7 RNAポリメラーゼによる錆型中のd x 2に対するr y T PのRNA中への取り込みを、次に示す反応、

【0036】

【化3】



【0037】

によって調べた（実施例3）。

この方法で製造された次の



（nはテンプレートの塩基Nに対応する塩基を示し、右肩のアスタリスクは標識化されていることを示す。）

塩基配列を有するRNAを、RNase T₂で分解して、次いで2次元TLC（セルロース樹脂）により、それぞれのヌクレオチドの比を求めた。

図4にそのTLCの展開図を示す。また、次の表1にそれぞれのヌクレオチドの組成比を示す。

【0038】

【表1】

template	rGp*	rAp*	rCp*	rUp*	rTp*
<u>N</u> = x ₂	3.982 (4)	1.052 (1)	0.950 (1)	0.047 (0)	0.969 (1)
<u>N</u> = A	3.939 (4)	1.035 (1)	0.995 (1)	1.032 (1)	not detected (0)

カッコ内の数値は理論値を示す

【0039】

表1中のカッコ内は、理論値を示す。

この結果、d×2を用いても高い選択性でrTpがd×2に対してのみ取り込まれることがわかった。以前のd×1を鋳型に用いた場合にも良い結果が既に得られていたが、同様の条件でd×2を鋳型に用いて転写反応を行い、d×2に対してRNA中に取り込まれたヌクレオチドの組成分析を行っても、同様に高い選択性でrTpがd×2に対してのみ取り込まれることになる。

【0040】

以上のように、これまでに報告された人工塩基対ではまだ達成されていない、選択性的塩基対形成を立体障害を利用することによって実現可能であることがわかった。核酸の複製、転写、および、これを用いたタンパク質合成システムあるいは機能性核酸にこのような人工核酸塩基対を適用できるものと思われる。

【0041】

【実施例】

次に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0042】

実施例1 2-イソブチリルアミノ-6-(2-チエニル)-9-[2-デオキシ-3-O-[(ジイソプロピルアミノ)-(2-シアノエトキシ)]ホスフィノ-5-O-ジメトキシトリチル-β-D-リボフラノシリ]プリン(6)の合成法(合成経路を図2に示す。)

【0043】

(A) 2-イソブチリルアミノ-6-ヨード-9-(2-デオキシ-3, 5-ジ-O-イソブチリル- β -D-リボフラノシリル) プリン(2) の合成
 2-イソブチリルアミノ-6-アミノ-9-(2-デオキシ-3, 5-ジ-O-イソブチリル- β -D-リボフラノシリル) プリン(1) (Barbara L. Gaffney, Luis A. Marky and Roger A. Jones, Tetrahedron, 40, 3-13 (1984)) 2. 3

8 g (5 mmol) をアルゴン雰囲気下で 60°C に加熱し、n-pentylnitrite 1 3. 5 ml (0. 10 mol) とジヨードメタン 25 ml (0. 31 mol) を素早く加え懸濁した。この混合物を 60°C でよく攪拌しながら 200 W ハロゲンタングステンランプにより光源距離 2 cm で可視光を 3 時間外部照射した。反応溶液に 30 ml の飽和亜硫酸ナトリウム水溶液を加え室温で 3 時間攪拌した。その後 120 ml の飽和亜硫酸ナトリウム水溶液と 150 ml のクロロホルムを加え分液した。水相をクロロホルムでさらに 2 回抽出した。得られた有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し濃縮した。残査をショートカラム（展開溶媒 酢酸エチル：ジクロロメタン = 1 : 4）で精製し目的物(2)を 1. 01 g (1. 72 mmol) (34. 4%) 得た。

【0044】

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃) δ :

8.19 (s, 1H), 8.14 (bs, 1H), 6.42 (dd, J = 7.4, 6.4 Hz, 1H),
 5.44 (m, 1H), 4.41 (m, 2H), 4.34 (m, 1H), 3.00 (m, 1H),
 2.80 (m, 1H), 2.58 (m, 3H), 1.17 (m, 18H).

【0045】

(B) 2-イソブチリルアミノ-6-(2-チエニル)-9-(2-デオキシ-3, 5-ジ-O-イソブチリル- β -D-リボフラノシリル) プリン(3) の合成

前記(A)で得た(2) 294 mg (0. 5 mmol) をアルゴン雰囲気下で 80 ml のチオフェンに溶解し、ファイレックス製光反応容器に移した。アルゴン気流下、400 W 水銀ランプ紫外線を 24 時間照射した。照射後の反応溶液を濃縮し、残査をショートカラム（展開溶媒 イソプロパノール：ジクロロメタン

= 3 : 1 9 7) で精製し目的物(3)を212mg(0.39mmol)(78.0%)得た。

¹H-NMR(270 MHz, CDCl₃) δ:

8.63 (dd, J = 3.8, 1.2 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.10 (bs, 1H),
 7.64 (m, 1H), 7.25 (m, 1H), 6.47 (dd, J = 7.9, 1.8 Hz, 1H),
 5.44 (m, 1H), 4.43 (m, 2H), 4.37 (m, 1H), 3.18 (m, 1H),
 3.00 (m, 1H), 2.61 (m, 3H), 1.24 (m, 18H).

【0046】

(C) 2-イソブチリルアミノ-6-(2-チエニル)-9-(2-デオキシ- β -D-リボフラノシリル)プリン(4)の合成

前記(B)で得た(3)212mg(0.39mmol)を氷冷下1M水酸化ナトリウム(ピリジン:メタノール:水=13:6:1)1.95mlに溶解し、15分間攪拌した。反応溶液に5%塩化アンモニウム水溶液を加え中和した。1.2gのセライトを加え減圧下完全に溶媒を除いた。残査をショートカラム(展開溶媒 5~7%エタノール-ジクロロメタン)で精製し目的物(4)を147mg(0.37mmol)(93.6%)得た。

¹H-NMR(270 MHz, DMSO-d6) δ:

10.45 (bs, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.60 (d, J = 3.5 Hz, 1H),
 7.90 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 4.6, 3.5 Hz, 1H),
 6.39 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 5.34 (d, J = 3.8 Hz, 1H),
 4.91 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 4.44 (m, 1H), 3.55 (m, 2H),
 2.96 (m, 1H), 2.74 (m, 1H), 2.33 (m, 1H), 1.11 (m 6H).

【0047】

(D) 2-イソブチリルアミノ-6-(2-チエニル)-9-(2-デオキシ-5-O-ジメトキシトリチル- β -D-リボフラノシリル)プリン(5)の合成

前記(C)で得た(4)98mg(0.24mmol)を1mlの無水ピリジンで3回共沸した。残査を2mlの無水ピリジンに溶解し、トリエチルアミン3.5ml、ジメチルアミノピリジン1.4mgそして塩化ジメトキシトリチル8.5

$m\ g$ を加え、室温で一晩攪拌した。反応溶液に 25 ml の酢酸エチルを加え 25 ml の水で 3 回分液し、有機相を得た。各々の水相を酢酸エチルで洗った。有機相を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下濃縮した。残査をショートカラム（展開溶媒 25~50% 酢酸エチルジクロロメタン）で 精製し目的物（5）132 mg (0.19 mmol) (76.7%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ :

8.64 (dd, $J = 3.6, 0.9$ Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.92 (bs, 1H),
 7.61 (dd, $J = 4.3, 0.9$ Hz, 1H), 7.39 (m, 2H), 7.24 (m, 8H),
 6.77 (m, 4H), 6.47 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 4.79 (m, 1H),
 4.13 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.75 (s, 3H),
 3.44 (dd, $J = 10.23, 5.8$ Hz, 1H),
 3.38 (dd, $J = 10.23, 4.4$ Hz, 1H), 2.91 (m, 1H),
 2.60 (m, 1H), 2.30 (m, 1H), 1.27 (m, 6H).

【0048】

(E) 2-イソブチリルアミノ-6-(2-チエニル)-9-[2-デオキシ-3-O-[ジイソプロピルアミノ)-(2-シアノエトキシ)]ホスフィノ-5-O-ジメトキシトリチル- β -D-リボフラノシル]プリン(6)の合成

前記(D)で得た(5)125 mg (0.18 mmol)を0.5 mlの無水ピリジンで3回共沸し、0.5 mlの無水テトラヒドロフランで3回共沸した。残査をアルゴン雰囲気下1.2 mlの無水テトラヒドロフランに溶解し、ジイソプロピルエチルアミン46 ml、そして塩化(2-シアノエトキシ)(N,N-ジイソプロピルアミノ)ホスフィン59 mlを加え、室温で1時間攪拌したのち50 mlのメタノールで未反応の塩化物を分解した。反応溶液に25 mlの3%トリエチルアミン含有酢酸エチルを加え25 mlの水で3回分液し、有機相を得た。各々の水相を3%トリエチルアミン含有酢酸エチルで洗った。有機相を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下濃縮した。残査をショートカラム（展開溶媒 3% トリエチルアミン-32% 酢酸エチル-65% ヘキサン）で精製し、目的物(6)139 mg (0.16 mmol) (92.2%)を得た。

【0049】

¹H-NMR(270 MHz, CDCl₃) δ:

8.64 (m, 1H), 8.16 (m, 1H), 7.86 (m, 1H), 7.61 (m, 1H),
 7.26 (m, 2H), 7.24 (m, 8H), 6.78 (m, 4H), 6.45 (m, 1H),
 4.75 (m, 1H), 4.23 (m, 1H), 3.75 (m, 6H), 3.70 (m, 4H),
 3.36 (m, 2H), 2.75 (m, 2H), 2.62 (m, 1H), 2.48 (m, 1H),
 1.95 (m, 1H), 1.18 (m, 18H).

³¹P-NMR(270 MHz, CDCl₃): 149.51, 148.43 ppm.

【0050】

実施例2 Klenowフラグメント (exo⁺) を用いた1ヌクレオチド挿入反応
 [5' - ³²P] ラベルしたプライマー-DNA (20-mer, 4 mM)、鑄型DNA (35-mer, 4 mM) および2x Klenowフラグメント用緩衝液 (TAKARA) を含む溶液を、95°C 3分間、40°C 3分間、4°C 7分間アニーリングした後、これに等量の40 mM dNTPとKlenowフラグメント (exo+) (2 units, For Sequencing, TAKARA) の溶液を加え、37°Cで30分インキュベートした。これに等量の10M urea-BPB dye 溶液を加えて、75°Cで5分間加熱した後、20%ポリアクリルアミド-7M尿素ゲルで電気泳動を行った。Phosphorimagerプレートを用いて生成物の分析を行った。結果を図3に示す。

【0051】

実施例3 T7 RNAポリメラーゼによる転写反応

プロモーター領域を二本鎖化した1 mMの鑄型DNA、2.5 unitsのT7 RNAポリメラーゼ、2 mM rNTP、0.1 mM Ci/mlの[α-³²P] rATPを含む溶液 (40 mM Tris-HCl (pH 8.0)、8 mM MgCl₂、2 mM spermidine、5 mM DTT、0.01% Triton X-100、10 mM rGMP) を調製し、3時間インキュベートした。これに10 M尿素を含む色素溶液を加え、75°Cで3分間加熱し反応を停止した。この溶液中の生成物のRNA (16-mer) を20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。このRNAを0.75 unitsのRNase T2で分解

し、2次元TLC（セルロース樹脂）により、それぞれのヌクレオチドの比を求めた。図4にそのTLCの展開図を示す。また、次の表1にそれぞれのヌクレオチドの組成比を示す。

【0052】

実施例4 プライマー及びテンプレートの合成

パーキンエルマー社アップライドバイオシステムズ事業部のDNA／RNA合成機392型により、同事業部より販売されている、dA、dC、dG、dTの各シアノエチルアミダイト試薬と実施例1の方法で合成した $d \times 2$ のシアノエチルアミダイト試薬を用いて、常法に従って、プライマー及びテンプレートを合成した。

ただし、ここで用いた $d \times 2$ の2-アミノ基の保護基のイソブチリル基は、オリゴマー合成後の通常の塩基性条件下（55°C、10時間の濃アンモニア水処理）での脱保護法では完全に除去できなかったので、80°C、10時間の濃アンモニア水処理を行った。

【0053】

【発明の効果】

本発明は、これまで報告された人工塩基対ではまだ達成されていない選択的な塩基対の形成を、立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を利用するこことによって実現可能であることを示すものである。本発明の方法により、核酸の複製、転写、および、これを用いタンパク質合成システムあるいは機能性核酸にこのような人工核酸塩基対を適用できる可能性が示された。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、従来の塩基対（図1a及びb）と、本発明の新規人工核酸塩基対（X2-Y）を示すものである。

【図2】

図2は、本発明の塩基X2を有する核酸の $d \times 2$ のアミダイト試薬の合成スキ

ームを示すものである。

【図3】

図3は、本発明のX2塩基に対する各種の塩基の取り込み結果を示す、図面に代わる写真である。

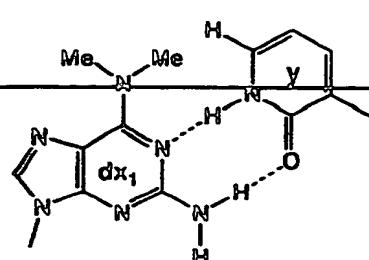
【図4】

図4は、すべてのrNTPを共存させたときに生成したRNAを電気泳動で精製し、これをRNaseT2によりヌクレオチドに完全分解し、その産物を二次元TLCで解析した結果を示すものである。

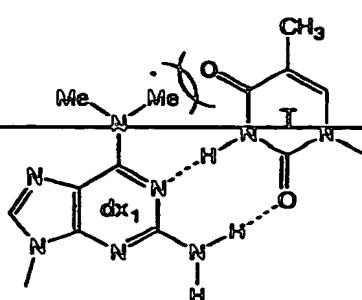
【書類名】 図面

【図1】

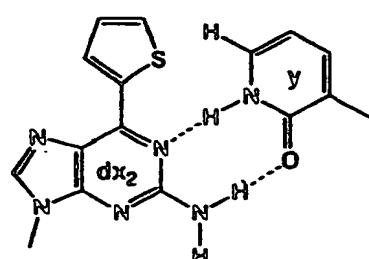
a



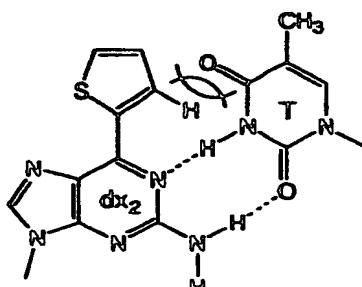
b



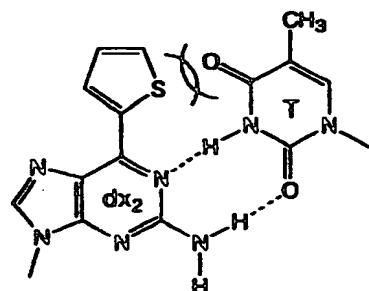
c



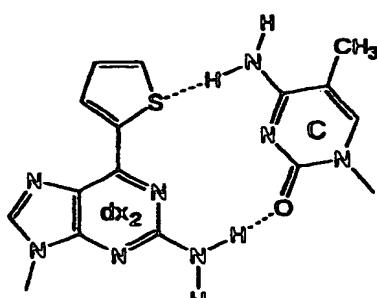
d



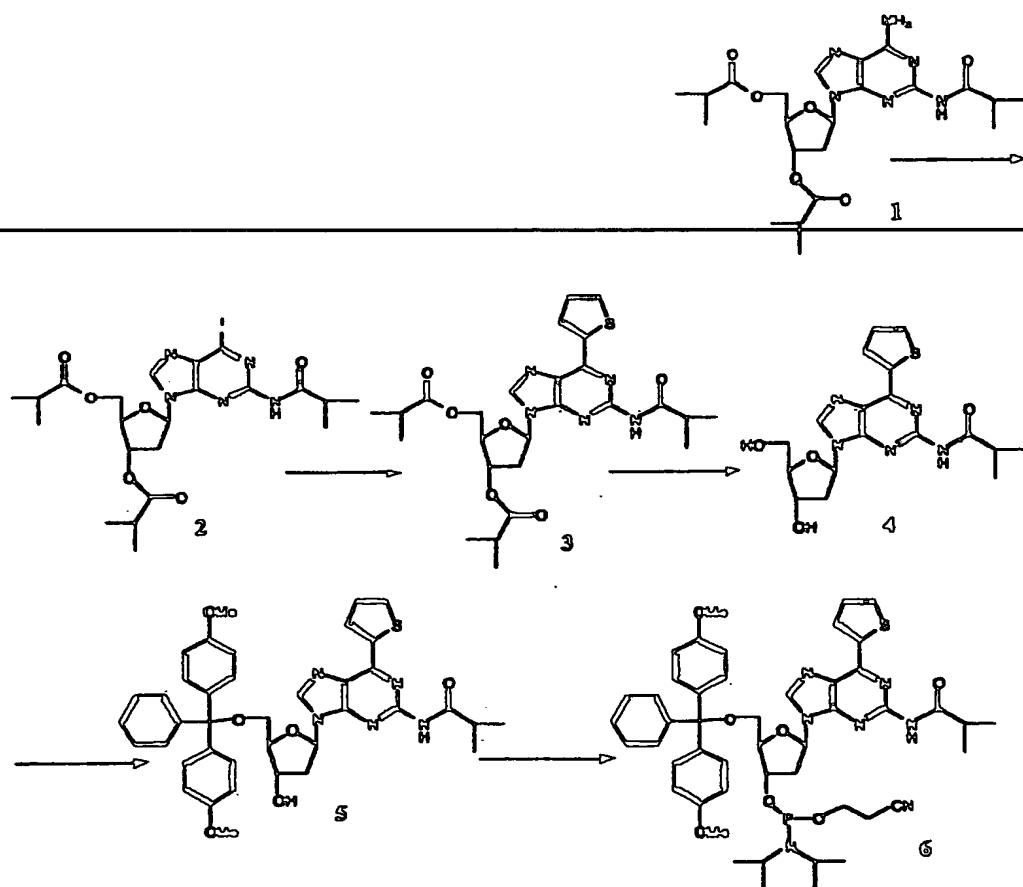
e



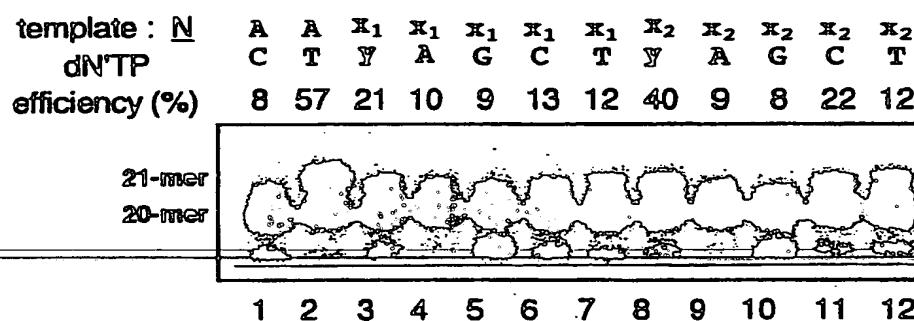
f



【図2】

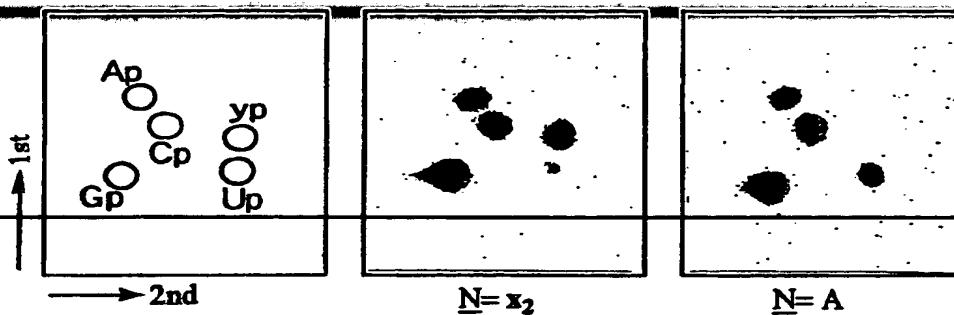


【図3】



特2000-133519

【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、DNAポリメラーゼなどのポリメラーゼによって塩基対が認識される際に、塩基対間の立体障害を利用して、選択的な新規な人工核酸塩基対を形成させる際に、さらに塩基間のスタッキングには悪影響を及ぼさず、塩基対平面にのみその立体障害を引き起こさせ、さらに好ましくは天然型の塩基との静電的な反発が利用でき得る塩基を選択するという概念を提供するものである。

【解決手段】 本発明は、核酸の塩基部分に立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基を導入することにより選択的な塩基対を形成させる方法に関し、さらに、本発明は、立体障害及びスタッキング作用を利用した選択的な塩基対を形成させることができる新規な人工核酸、その製造方法、それを含有してなるコドン、それを含有してなる核酸分子、それを用いた非天然型の遺伝子の製造方法、前記核酸分子又は非天然型の遺伝子を用いた新規な蛋白質の製造方法などに関する。

【選択図】 なし

特2000-133519

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名 科学技術振興事業団